

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Dezember 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/96286 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07C 257/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/06789

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Juni 2001 (15.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 29 014.0 15. Juni 2000 (15.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FRIEDRICH-SCHILLER- UNIVERSITÄT JENA** [DE/DE]; Fürstengraben 1, 07743 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STÜRZEBECHER, Jörg** [DE/DE]; Hubertusstrasse 38, 99094 Erfurt (DE). **STEINMETZER, Torsten** [DE/DE]; Ricarda-Huch-Weg 23, 07743 Jena (DE). **KÜNZEL, Sebastian** [DE/DE]; St.-Jakob-Strasse 6, 07743 Jena (DE). **SCHWEINITZ, Andrea** [DE/DE]; Gustav-Fischer-Strasse 15, 07745 Jena (DE).

(74) Anwälte: **BOCK, Gerhard** usw.; Pfeiffer & Partner, Winzerlaer Strasse 10, 07745 Jena (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- insgesamt in elektronischer Form (mit Ausnahme des Kopfbogens); auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: UROKINASE INHIBITORS

(54) Bezeichnung: UROKINASE-HEMMSTOFFE

(57) Abstract: The invention relates to a highly active, highly specific urokinase inhibitor which is suitable for therapeutic applications and can be synthesized in an extremely simple manner. Surprisingly, it was found that amidino benzylamine derivatives, especially 4-amidino-benzylamine, with two bonded amino acids represent a new group of highly active and very selective uPA inhibitors. The urokinase inhibitors can be used in medical applications, e.g. in the treatment of malign tumours such as in cases of metastatic spread.

(57) Zusammenfassung: Es soll ein auch für therapeutische Anwendungen geeigneter Wirkstoff angegeben werden, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Syntheseaufwand herstellbar ist. Überraschend wurde gefunden, dass Derivate des Amidinobenzylamins, insbesondere des 4-Amidinobenzylamins, mit zwei gebundenen Aminosäuren eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. Die Urokinase-Hemmstoffe werden für medizinische Anwendungen, beispielsweise zur Behandlung von malignen Tumoren sowie der Metastasierung, eingesetzt.



WO 01/96286 A2

Urokinase-Hemmstoffe

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft neue Hemmstoffe der Urokinase zur Behandlung von malignen Tumoren und der Metastasierung.
- Die Ausbreitung und Metastasierung solider Tumoren in umgebendem Gewebe wird durch ihre Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix in der Umgebung der Tumorzelle abzubauen bzw. die Basalmembran zu
- 10 durchdringen, ermöglicht. In diesem Prozess kommt neben verschiedenen Matrixmetalloproteinasen und Cathepsinen vor allem dem Plasminogenaktivator Urokinase (uPA) eine zentrale Bedeutung zu (P. Mignatti und D.B. Rifkin, *Physiol. Rev.* 73, 161-195, 1993). So bewirkt uPA die Aktivierung von Plasminogen; das entstehende Plasmin kann die
- 15 Komponenten der extrazellulären Matrix (Fibrin, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane u.a.) abbauen sowie Metalloproteasen und pro-Urokinase zu uPA aktivieren (U. Reuning et al., *Int. J. Oncol.* 13, 893-906, 1998).
- Sowohl pro-Urokinase als auch uPA binden an den uPA-Rezeptor (uPAR), einen an der Zelloberfläche lokalisierten, spezifischen Rezeptor.
- 20 Dadurch wird eine Verstärkung und Fokussierung der Aktivität von uPA und damit der Plasminogenaktivierung in der direkten Umgebung der Tumorzelle erreicht. Sowohl in zellbiologischen Studien als auch in Tiermodellen konnte die Bedeutung dieses zellassozierten Plasminogenaktivator-Systems für Tumorwachstum und -ausbreitung
- 25 gezeigt werden. So wird das invasive Potential von Tumorzellen bei Hemmung der enzymatischen Aktivität von uPA durch die natürlichen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 herabgesetzt (J.-F. Cajot et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6939-6943, 1990; M. Baker et al., *Cancer Res.* 50, 4876-4684, 1990). In Hühnerembryos konnte durch Zugabe von
- 30 Antikörpern gegen uPA die durch menschliche Karzinomzellen verursachte Bildung von Lungenmetastasen fast vollständig verhindert werden (L. Ossowski et al., *Cell* 35, 611-619, 1983).
- Die Faktoren des Plasminogenaktivator-Systems (uPA, uPAR, PAI-1 und PAI-2) sind in den letzten Jahren in Hinsicht ihrer klinischen
- 35 Relevanz für die Prognose von Patienten mit soliden malignen Tumoren intensiv untersucht worden. Insbesondere der Gehalt von uPA im

- 2 -

Gewebe verschiedener Tumoren erwies sich als ein Prognosefaktor. So haben Patienten mit hohem uPA-Spiegel eine schlechtere Prognose als solche mit niedriger uPA-Konzentration im Tumor (M. Schmitt et al., Thromb. Haemost. 78, 285-296, 1997; R.W. Stephens et al., Breast Cancer Res. Treat. 52, 99-111, 1998). Auch eine erhöhte Konzentrationen an uPAR im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose (H. Pedersen et al., Cancer Res. 54, 4671-4675, 1994; C. Duggan et al., Int. J. Cancer 61, 597-600, 1995).

Aus den Befunden zum prognostischen Wert des uPA- und uPAR-Gehaltes im Tumorgewebe kann angenommen werden, dass synthetische uPA-Inhibitoren in der Lage sind, Invasion und Ausbreitung von Tumorzellen zu unterdrücken. Die Zahl der bisher bekannten uPA-Hemmstoffe ist allerdings relativ klein. Die Mehrzahl besitzt nur eine geringe Spezifität und Wirkungsstärke, wie es für verschiedene Benzamidin- und β -Naphthamidin-Derivate zutrifft (J. Stürzebecher und F. Markwardt, Pharmazie 33, 599-602, 1978). Das von Vassalli und Belin (FEBS Letters 214, 187-191, 1997) als uPA-Hemmstoff beschriebene Amilorid ist zwar ein spezifischer, aber schwacher Inhibitor von uPA ($K_i = 7 \mu\text{M}$).

Stärker wirksame uPA-Inhibitoren wurden mit 4-substituierten Benzothiophen-2-carboxamidinen ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$ für Verbindung 623) gefunden. Hemmstoffe dieses Typs inaktivieren auch uPA, die an uPAR gebunden ist (M.J. Towle et al., Cancer Res. 53, 2553-2559, 1993). Die Benzothiophen-Derivate sind sehr spezifisch, ihre Hemmwirkung gegenüber Plasmin und dem Plasminogenaktivator vom Gewebetyp (tPA) ist gering, allerdings ist die Synthese von Verbindungen dieses Typs sehr aufwändig.

Eine vergleichbare Spezifität haben auch 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate, deren Hemmwirkung gegenüber uPA ($K_i = 2,4 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung) allerdings vergleichsweise gering ist (S. Sperl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5113-5118, 2000).

Im Gegensatz dazu erreichen $N\alpha$ -Triisopropylphenylsulfonyl-3-amidinophenylalanin-Derivate mikromolare K_i -Werte ($0,41 \mu\text{M}$ für die wirksamste Verbindung), sind allerdings sehr unspezifische uPA-Hemmstoffe, mit gleicher oder stärkerer Wirkung werden Trypsin, Thrombin und Plasmin inhibiert (J. Stürzebecher et al., Bioorg. Med.

Letters 9, 3147-3152, 1999). Sehr wirksame uPA-Hemmstoffe sind in der WO 99/05096 mit weiterentwickelten β -Naphthamidinen offenbart. Es werden IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich beschrieben, allerdings keine Angaben zur Selektivität und der biologischen Wirksamkeit gemacht.

Bisher wurden nur wenige Peptide als uPA-Hemmstoffe beschrieben, die sich von der Substrat-Sequenz ableiten. Kettner und Shaw (Methods in Enzymology, 80, 826-842, 1981) beschrieben Chlormethylketone, die zwar uPA irreversibel hemmen, aber nicht für in vivo-Anwendung geeignet sind.

In der EP 18 32 71 sind Lysin-Derivate offenbart, die eine gewisse uPA-Hemmung bewirken, allerdings auch andere vergleichbare Enzyme hemmen und damit nur sehr speziell bzw. eingeschränkt für medizinische Zwecke verwendbar sind. Gleiches gilt für die in der WO 95/17 8 85 als uPA-Inhibitoren beschriebenen niedermolekularen Polypeptide (ca. 50 Aminosäuren), die sich von natürlichen Hemmstoffen ableiten. Auf Grund ihres Peptidcharakters und der Molekülgröße ist ihr in vivo-Einsatz stark eingeschränkt.

In jüngster Zeit wurden allerdings in WO 00/05 2 45 Peptidylaldehyde mitgeteilt, die C-terminal ein Argin und in P3 ein D-Serin enthielten und uPA wirksam hemmten. Jedoch bedingt die Aldehydfunktion Instabilität und eine geringe Selektivität. Nach Acylierung des Ser-Hydroxyl konnte für die Leitverbindung iBuOCO-D-Ser-Ala-Arg-H nach s.c.-Gabe eine relative Bioverfügbarkeit von 87 % beobachtet werden (S. Y. Tamura et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, 983-987, 2000).

Ferner wurden bei der Suche nach Hemmstoffen des Thrombins, einem mit uPA verwandten Enzym, mit Tripeptid-Derivaten vom D-Phe-Pro-Arg-Typ sowohl in Hinblick auf Hemmwirkung als auch Bioverfügbarkeit bemerkenswerte Fortschritte erzielt; wenn C-terminal Agmatin, trans-4-Aminomethyl-cyclohexylamin oder 4-Amidino-benzylamin eingebaut wurde. Es wurden picomolare K_i -Werte erreicht und die orale Bioverfügbarkeit verbessert (T.J. Tucker et al., J. Med. Chem. 40, 1565-1569 und 3687-3693, 1997); allerdings wurden keine uPA-Hemmstoffe gefunden. So hemmt Melagatran, das C-terminal einen 4-Amidino-benzylamid-Rest besitzt, Trypsin ($K_i = 4,0$ nM) und Thrombin ($K_i = 2,0$ nM) sehr unspezifisch, während die Hemmung von

- 4 -

uPA mit einem $K_i = 6,3 \mu\text{M}$ drei Größenordnungen schwächer ist (D. Gustafsson et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 7, 69-79, 1996; WO 94/29336).

- 5 Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, einen auch für therapeutische Anwendungen geeigneten Wirkstoff anzugeben, der Urokinase mit hoher Aktivität und Spezifität hemmt und der mit möglichst geringem Synthesaufwand herstellbar ist.
- 10 Überraschend wurde gefunden, dass acyliertes Amidino-benzylamin gemäß der im Patentanspruch 1 angeführten allgemeinen Formel I, insbesondere Verbindungen des 4-Amidino-benzylamins, bei denen X , R_1 , R_2 und R_3 natürliche und/oder unnatürliche Aminosäuren ergeben, Urokinase sehr wirksam und selektiv hemmen. Einen besonders aktiven
- 15 Urokinase-Hemmstoff bildet dabei Amidino-benzylamin, wenn die Amidinogruppe in 4-Position steht, als Aminosäuren Gly und D-Ser gebunden sind und wenn die Verbindung eine N-terminale Schutzgruppe R_4 aus einem Aryl- bzw. Alkyl-sulfonyl-Rest aufweist. Ester, insbesondere solche mit Oxycarbonsäuren, können als Prodrug
- 20 eingesetzt werden, wenn sie im Verlauf der enteralen Aufnahme hydrolysiert werden. Es wurde auch überraschend gefunden, dass einige dieser Oxycarbonyl-Derivate der erfindungsgemäßen Verbindungen ebenfalls sehr starke Urokinase-Hemmstoffe sind.
- 25 Neben Urokinase wurden durch die Glycin-Derivate andere Enzyme deutlich weniger gehemmt, so dass diese erfindungsgemäßen Derivate des Amidino-benzylamins eine neue Gruppe von hochaktiven und sehr selektiven uPA-Hemmstoffen darstellen. Im Gegensatz dazu hemmen Verbindungen, die als R_1 kein H tragen, (z. B. Alanin-Derivate) Urokinase nicht mehr selektiv, sondern sind auch starke Hemmstoffe von Trypsin,
- 30 Thrombin und Plasmin.
- Die Verbindungen liegen in der Regel als Salze mit Mineralsäuren, bevorzugt als Hydrochloride, vor oder als Salze mit geeigneten organischen Säuren.

- 5. -

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können, wie nachfolgend beschrieben, nach bekannten Verfahren auf relativ einfache Weise hergestellt werden:

Die Ausgangsverbindung 4-Cyanobenzylamin wird über Gabrielsynthese
5 (G. Wagner und I. Wunderlich, Pharmazie 32, 76-77, 1977; B.C. Bookser und T.C. Bruice, J. Am. Chem. Soc. 113, 4208-4218, 1991) aus 4-Cyanobenzylbromid hergestellt. Aus dem so hergestellten 4-Cyanobenzylamin wird das Boc-geschützte Acetyloxamidino-benzylamin gewonnen. Die Ankopplung der weiteren Aminosäuren und
10 der Schutzgruppe R₄ erfolgt mittels Standardkopplungsmethoden mit Boc als N-terminale Schutzgruppe. Die zweite Aminosäure kann auch direkt als N-aryl- bzw. N-aralkyl-sulfonyl-geschützte Aminosäure gekoppelt werden. Die Peptidanaloga werden sequentiell, beginnend vom Acetyloxamidino-benzylamin, aufgebaut. Zur Synthese der
15 entsprechenden Ester wird die Zielverbindung mit dem entsprechenden Säurechlorid umgesetzt. Die meisten Produkte kristallisierten gut und lassen sich damit einfach reinigen. Die Reinigung der Hemmstoffe erfolgt in der letzten Stufe über präparative, reversed-phase HPLC.

20 Die Erfindung soll nachstehend anhand von zwei Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

Ausführungsbeispiel 1:

25 Synthese von Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl

1.1 Boc-4-Cyano-benzylamid

20 g (0,151 mol) 4-Cyano-benzylamin wurden in 300 ml H₂O, 150 ml Dioxan und 150 ml 1 N NaOH gelöst. Unter Eiskühlung wurden 37,5 ml
30 Di-tert.-butyl-dicarbonat zugetropft und eine Stunde bei 0 °C sowie weitere 24 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Dioxan wurde im i.V. entfernt und der wässrige Rückstand 3-mal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden 3-mal mit 5 %-iger KHSO₄- und 3-mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und i.V.
35 eingeengt (weiße Kristalle). HPLC: Acetonitril/H₂O, Elution bei 44,1 % Acetonitril; Ausbeute: 30,48 g (0,131 mol), 87 %.

- 6 -

1.2 Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid

Nach Judkins et al. (Synthetic Comm. 26, 4351-4367, 1996) wurden 30,48 g (0,131 mol) Boc-4-Cyano-benzylamid mit 13,65 g (0,197 mol) Hydroxylamin x HCl und 34 ml (0,197 mol) DIEA in 300 ml abs. Ethanol gelöst. Es wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Ansatz i.V. eingeeengt, der Rückstand in ca. 200 ml Essigsäure gelöst und mit 18,67 ml (0,197 mol) Essigsäureanhydrid versetzt. Nach 1 Std. wurde erneut eingeeengt, in Essigester gelöst und bei 0 °C je 3-mal mit 5 %iger KHSO₄- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen i.V. fiel ein weißes Pulver an. HPLC: Acetonitril/H₂O, Elution bei 32,0 % Acetonitril; Ausbeute: 31,3 g (0,102 mol) 78 %.

1.3 4-Acetyloxamidino-benzylamin x HCl

5 mmol Boc-4-Acetyloxamidino-benzylamid werden in 20 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wird i.V. weitgehend eingeeengt, das Produkt mit trockenem Diethylether gefällt, abgefrittet, nochmals mit frischem Ether gewaschen und i.V. getrocknet. Auf Grund der quantitativen Umsetzung wurde das Produkt ohne weitere Reinigung für den nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

1.4 Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid

Die Kopplung von Boc-Gly-OH (Orpegen, Heidelberg) an 4-Acetyloxamidino-benzylamin erfolgte nach Frérot et al. (Tetrahedron 47, 259 ff., 1991). Dazu wurden 2,064 g (9,3 mmol) 4-Acetyloxamidino-benzylamin x HCl und 1,629 g (9,3 mmol) Boc-Gly-OH in ca. 25 ml DMF gelöst. Bei 0 °C wurden dann 4,84 g (9,3 mmol) PyBOP und 3,878 ml (27,9 mmol) TEA zugegeben und der pH-Wert mit TEA auf 9 eingestellt. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i.V. eingeeengt, in Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer, basisch und neutral gewaschen, getrocknet und eingeeengt. Ausbeute: 3 g (8,2 mmol) 88 %.

- 7 -

1.5 Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid x AcOH

3 g (8,2 mmol) Boc-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid wurden in 200 ml 90 %iger Essigsäure gelöst. Anschließend wurden unter Argon 300 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle zugesetzt. Argon wurde durch
5 eine Wasserstoffatmosphäre ersetzt und der Ansatz unter kräftigem Rühren 24 Std. hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und das Filtrat i.V. eingengt. Ausbeute: 2,9 g (7,9 mmol) 96 %.

1.6 H-Gly-4-Amidino-benzylamid x 2 HCl

2,9 g (7,9 mmol) Boc-Gly-4-Amidino-benzylamid wurden in 100 ml 1 N HCl in Eisessig gelöst und 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde i.V. weitgehend eingengt und mit trockenem Diethylether gefällt, danach abgefrittet und das Produkt nochmals mit frischem Ether gewaschen. Nach Trocknen des Produkts i.V. wurde es ohne weitere
15 Aufreinigung für die Synthese nach Punkt 1.8 eingesetzt.

1.7 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH

229 mg (1,173 mmol) H-D-Ser(Bz)-OH (Bachem, Heidelberg) und 408 µl (2,345 mmol) DIEA wurden in 50 ml 50 % Acetonitril gelöst.
20 Dann wurden 335 mg (1,76 mmol) Benzylsulfonylchlorid zugegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde i.V. eingengt, mit Essigester aufgenommen und je 3-mal sauer und neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde i.V. eingengt. Ausbeute: 289 mg (0,827 mmol) 71 %.

1.8 Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Amidino-benzylamid x TFA

151 mg (0,433 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-OH und 121 mg (0,433 mmol) H-Gly-4-Amidino-benzylamid x 2 HCl wurden in wenig abs. DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden 225 mg (0,433 mmol) PyBOP
30 und 230 µl (1,32 mmol) DIEA zugegeben. Nach 1 Std. Rühren bei Raumtemperatur wurde i.V. eingengt und das Produkt über HPLC gereinigt (Acetonitril/H₂O, 0,1 % Trifluoressigsäure, Elution bei 37,4 % Acetonitril).
Ausbeute: 232 mg (0,356 mmol) 82 %.

- 8 -

1.9 Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl

50 mg HPLC-gereinigtes Benzylsulfonyl-D-Ser(Bz)-Gly-4-Acetyloxamidino-benzylamid x TFA werden in 50 ml 90 %iger Essigsäure gelöst und mit 50 mg 10 % Palladium auf Aktivkohle 48 Std. bei Raumtemperatur hydriert. Danach wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat i.V. eingeengt. Das Produkt wird über HPLC gereinigt (Acetonitril/H₂O mit 0,1 % TFA, Elution auf analytischer HPLC bei 21,4 % Acetonitril) und mittels Ionenaustauscher in die HCl-Form überführt.

10 Ausbeute: 20 mg (0,041 mmol) 54 %.

1.10 Benzylsulfonyl-D-Ser(COO-Isobutyl)-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl

30 mg (0,062 mmol) Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-Amidino-benzylamid x HCl werden in 3 ml Pyridin unter Zusatz von 1 ml Acetonitril bei Raumtemperatur gelöst. Unter Eiskühlung werden 16,1 µl (0,124 mmol) Chlorameisensäureisobutylester hinzugegeben. Der Ansatz wird 30 Minuten unter Eiskühlung und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird i.V. entfernt und das Produkt über HPLC gereinigt (Elution auf analytischer HPLC bei 37,9 % Acetonitril) und mittels Ionenaustauscher in die HCl-Form überführt.

20 Ausbeute: 13 mg (0,022 mmol) = 36 %.

Ausführungsbeispiel 2:

25

Hemmung von Urokinase durch ausgewählte Verbindungen mit
Y = Amidino

R ₄	Konfiguration R ₃	R ₃	R ₂	X-R ₁	Position Amidino	K _i , µM
H	L	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	21
Boc	L	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	23
H	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	12
Ac	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	41
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	0,036

- 9 -

CMe-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂	4	0,048
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O- Bz	H	CH ₂	4	0,84
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -OH	H	CH ₂ -CH ₃	4	0,0077
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O- COO-CH ₃	H	CH ₂	4	0,39
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O- COO-iBu	H	CH ₂	4	0,50
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O- COO-iBu	H	CH ₂ -CH ₃	4	0,043
H	D	CH ₂ -O- Bz	H	CH ₂	3	> 1000
Boc	D	CH ₂ -O- Bz	H	CH ₂	3	> 1000
Bz-SO ₂	D	CH ₂ -O- Bz	H	CH ₂	3	> 1000

Bestimmung der Hemmwirkung:

Zur Bestimmung der Hemmwirkung wurden 200 µl Tris-Puffer (0,05 M,
 5 0,154 M NaCl, 5 % Ethanol, pH 8,0; enthält den Inhibitor), 25 µl
 Substrat (Bz-βAla-Gly-Arg-pNA in H₂O) und 50 µl sc-Urokinase bei
 25 °C inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl
 Essigsäure (50%) unterbrochen und die Absorption bei 405 nm mittels
 Microplate Reader (Dynatech MR 5000) bestimmt. Die K_i-Werte wurden
 10 nach Dixon (Biochem. J. 55, 170-171, 1953) durch lineare Regression
 mittels eines Computerprogramms ermittelt. Die K_i-Werte sind das
 Mittel aus mindestens drei Bestimmungen.

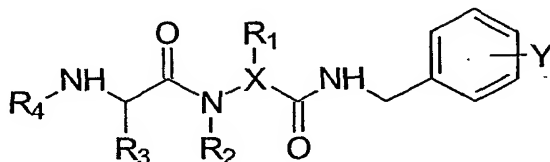
Verwendete Abkürzungen:

Ac	Acetyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bz	Benzyl
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
i. V.	im Vakuum
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-N-oxy- tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
CMe	Cyclohexylmethyl
iBu	iso-butyl

Patentansprüche

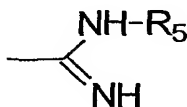
1. Urokinase-Hemmstoffe der allgemeinen Formel I:

5



10

in denen der Substituent Y in 3- oder 4-Position vorkommen kann und eine Amidino-Gruppe



15

darstellt, in welcher R₅ ein H, ein OH oder einen Carbonylrest-CO-R bzw. Oxycarbonylrest -COO-R besitzt, wobei R ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest oder ein substituierter oder unsubstituierter Aralkyl- oder Heteroaralkylrest sein kann,

20

X eine CH-Gruppe oder N ist,

R₁ als H bzw. als ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-8 C-Atomen oder als ein (CH₂)_n-OH mit n = 1-5 ausgebildet ist,

R₂ ein H oder ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-8 C-Atomen ist,

25

R₃ als ein (CH₂)_n-OH mit n = 1-5 ausgebildet ist oder ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-8 C-Atomen ist bzw. als Prodrug-Form mit einem (CH₂)_n-OX und n = 1-5 vorliegt, wobei X ein Alkyl-, Aralkyl- bzw Aralkylcarbonyl- oder ein entsprechender Oxycarbonyl-Rest sein kann,

30

und R₄ einen Sulfonylrest -SO₂-R, einen Carbonylrest -CO-R, einen Oxycarbonylrest -COO-R oder ein H darstellt, wobei R ein verzweigtes oder unverzweigtes Alkyl mit 1-16 C-Atomen, ein substituierter oder unsubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, ein

- 12 -

substituierter oder unsubstituierter Aralkyl- oder Heteroaralkylrest, ein Adamantyl- oder ein Campherrest ist.

- 5 2. Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im Amidino-benzylamid die Amidinogruppe in 4-Position steht und dass daran die Aminosäuren Gly und D-Ser sowie als R₄ ein Aryl- oder ein Aralkylsulfonyl-Rest gebunden sind.
- 10 3. Verwendung der Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von oral, subkutan, intravenös bzw. transdermal verabreichbaren Arzneimitteln für die Tumorbekämpfung.
- 15 4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Urokinase-Hemmstoffe als Arzneimittel in Form von Tabletten, Dragées, Kapseln, Pellets, Suppositorien, Lösungen oder Pflaster etc. eingesetzt werden.
5. Verwendung der Urokinase-Hemmstoffe gemäß Anspruch 1 als diagnostisches Mittel, insbesondere bei der Tumoruntersuchung.